

モノクローナル抗体によるヒトアミロイド関連蛋白の免疫学的解析

山下 昇 史

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Immunological Analysis of Amyloid-related Protein Detected by a Monoclonal Antibody

Takafumi YAMASHITA

Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. Yachi)

Monoclonal antibody AM34 was generated from the fusion of mouse myeloma P3-X63-Ag8.653 cells with splenocytes obtained from a BALB/c mouse that had been immunized with crude amyloid proteins which were extracted from the amyloid kidney of a patient with rheumatoid arthritis. This antibody bound specifically to amyloid deposits of the AA type of formalin-fixed paraffin-embedded sections, but reacted little or not at all with other tissues including sections of patients with primary and AL type amyloidosis. This reaction was not inhibited by the pretreatment of sections with polyclonal anti-human amyloid antibodies to AA protein. A reversed passive hemagglutination assay (RPHA) using sheep red cells coated antibody AM34 showed the presence of a corresponding antigen in the sera from patients with malignant or inflammatory diseases. Sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis and western blot analysis demonstrated that the corresponding antigen consisted of 45,000 and 42,000 dalton molecules under reducing and non-reducing conditions, when crude amyloid proteins and the sera showing higher titers in RPHA were tested.

Interestingly, monoclonal antibody AM34 clearly reacted with senile plaques in the brain tissues obtained from two patients with Alzheimer's disease.

Therefore, these data suggest that antibody AM34 may recognize a novel protein having a 45,000 and 42,000 dalton molecular weight which is strongly associated with secondary amyloidosis and probably with Alzheimer's disease. (Received December 22, 1986 and accepted January 26, 1987)

Key words: Amyloidosis, Amyloid-related proteins, Monoclonal antibody, Alzheimer's disease

1 緒 言

アミロイドーシスは特異な構造を有するアミロイド蛋白が全身の諸臓器に沈着する代謝性疾患である。アミロイド蛋白は組織学的にヘマトキシリン・エオジン染色でエオジン好性に均一に染色される硝子様構造をもち、コンゴレッド染色にて緑色偏光を示す¹⁾特徴をもつ。電子顕微鏡的には幅 50-70Å の細線維構造を有し、X線回折にて交叉性の β -pleated sheet 構造を示すことが明らかにされている^{2,3)}。このような特徴を持つアミロイド蛋白も化学的に単一の物質ではなく現在までに種々のタイプに分類され、その性状も次第に明ら

かにされつつある。さらに最近はアルツハイマー型痴呆を呈する患者脳の老人斑におけるアミロイド沈着が明らかにされ、その成因、病態との関連で注目を集めている。しかしこれらのアミロイド蛋白の異同、あるいはアミロイド関連蛋白の組織及び血中における分子レベルでの検索については研究の途についたばかりであり、したがってアミロイドーシスの診断及び治療についても今後の研究に待つところが多い。

本研究においては全身性アミロイドーシス患者の剖検材料を免疫原として、アミロイド蛋白に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫学的観点からヒトアミロイド関連蛋白を組織レベル及び抗原レベルで解析し

興味ある知見を得たので報告する。

2 研究方法

2.1 アミロイド蛋白の抽出

アミロイド蛋白の抽出原として使用した症例は59歳の女性で、臨床診断は慢性腎不全を呈する慢性関節リウマチ、またそれに続発した全身性アミロイドーシスである。この症例の剖検腎を材料として、Pras *et al.*⁴⁾の蒸留水抽出法に基づいてアミロイド蛋白の抽出を行った。すなわち、腎組織（湿重量 20 g）を冷生理的食塩水 400 ml にてホモジナイズし遠心により沈渣を得、これを同量の冷生理的食塩水にて洗浄、遠心操作を上清の蛋白濃度（OD_{280nm}）が 0.075 以下になるまで繰り返した。次に、得られた沈渣を蒸留水 200 ml にて同じくホモジナイズ、遠心を 4 回繰り返してそれぞれの上清をブール後、凍結乾燥し 200 mg の粗アミロイド蛋白を得た。

2.2 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は Köhler and Milstein⁵⁾ に準じて以下の方法で作製した。すなわち、2.1 で得た粗アミロイド蛋白 1 mg を Freund's complete adjuvant に懸濁し、2 週間隔で 2 回、7 週齢雄 BALB/c マウス（日本クレア）の皮下に免疫し、さらに 2 mg を蒸留水に溶解して腹腔内に免疫、3 日後に脾を摘出し、マウス骨髄腫細胞 X 63-Ag 8.653⁶⁾ と型のごとく⁷⁾ 細胞融合を行った。2.3 に示す方法により選択したハイブリドーマを限界希釈法にてクローニングし、細胞培養フラスコ（Corning 25110, USA）を用いて大量に培養あるいは BALB/c マウス（日本クレア）腹腔内にて増殖させた。培養上清及び腹水は 50% 硫酸塩析を 2 回繰り返して PBS に透析して粗精製した。またウサギ抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM（Miles, USA）により Ouchterlony 法⁸⁾ を用いて免疫グロブリンサブクラスを決定した。

2.3 ハイブリドーマのスクリーニング

2.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Magnani *et al.*⁹⁾ の方法に従いハイブリドーマ培養上清のスクリーニングを行った。2.1 により作製した粗アミロイド蛋白を蒸留水にて 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液とし、平底マイクロプレート（Falcon, USA）に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ入れ、4°C overnight 反応させ、2% 牛血清アルブミン（BSA）にて blocking 後、培養上清を 37°C、1 時間反応させた。次にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン（DAKO, Denmark）を反応させ、

o-フェニレンジアミンにて発色させ、492 nm で吸光度を測定した。

2.3.2 間接免疫ペルオキシダーゼ法

2.1 で粗アミロイド蛋白の抽出を行った剖検腎を 10% ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後 4-5 μm に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色、及びコンゴアレッド染色を行いアミロイド蛋白の沈着部位を確認した後、同切片に対して培養上清を用いて 2.4.2 に示す間接ペルオキシダーゼ法を行った。

2.4 対応抗原の免疫組織学的検索

2.4.1 組織材料

1967-1986 年までに行われた剖検、手術及び生検材料、計 25 症例、36 組織切片を対象とした。内訳は原発性あるいは多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシス 12 症例、21 組織切片、続発性アミロイドーシス 6 症例、8 組織切片、家族性ポリニューロパチーに伴うアミロイドーシス 2 症例、老人斑を有するアルツハイマー型痴呆 2 症例、脾限局性アミロイド 1 症例、内分泌腫瘍に合併するアミロイド 1 症例、皮膚アミロイド 1 症例である。各組織はすべて 10%ホルマリンに固定し、パラフィン包埋後、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色、コンゴアレッド染色を行いコンゴアレッド染色標本にてアミロイド蛋白沈着部位に一致して偏光顕微鏡下で緑色偏光が認められたものである。

2.4.2 免疫ペルオキシダーゼ染色

遠藤・今井が述べた方法¹⁰⁾に従った。すなわち、脱パラフィン後の各組織切片について 0.6% H₂O₂ メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し、次に切片への二次抗体の非特異的吸着を阻止するため正常ウサギ血清を反応させ、その後一次抗体としてモノクローナル抗体を反応させた。次に、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン（DAKO, Denmark）を反応させ、発色は 3-3'-diaminobenzidine（東京化成）を用い、核染色は 1%メチルグリーンにより行った。対照標本には免疫グロブリンサブクラスが同一（IgG1）で特異性の異なるモノクローナル抗体を一次抗体の代わりに用いた。

2.5 粗アミロイド蛋白による吸収試験

ELISA で得られた結果を組織切片上で確認するために、一次抗体であるモノクローナル抗体を切片上に反応させる前にこれを粗アミロイド蛋白と混じり、37°C、30 分間反応させ遠心後その上清を一次抗体として用い、モノクローナル抗体が粗アミロイド蛋白により吸収されるか否かを検討した。組織切片は 2.3.2 で述べた剖検腎切片を使用した。

2.6 ウサギ抗ヒトアミロイド A (AA) ポリクローナル抗体による阻止試験

免疫ペルオキシダーゼ染色においてモノクローナル抗体を反応させる前に、ウサギ抗ヒトアミロイド A (AA) 抗血清 (Kyowa Medex) を PBS にて各段階に希釈した後、37℃、30 分間反応させ、以下 2・4・2 の手順に従って処理し、上記ポリクローナル抗体の反応によってモノクローナル抗体の反応が阻止されるか否かを検討した。陽性対照として AA 抗血清を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン血清 (DAKO, Denmark) を PBS にて 40 倍希釈したものを用い、モノクローナル抗体による組織切片の染色性と比較検討した。

2.7 血清中対応抗原の検出

2.7.1 対 象

CRP 陽性患者 41 例、CRP 陰性患者 31 例、正常対照群 10 例、計 82 例を血清中対応抗原検出の対象とした。患者群の内訳は感染症 34 例、リウマチ性疾患 7 例、悪性腫瘍 13 例 (固形癌 9 例、白血病 3 例、悪性リンパ腫 1 例)、良性非炎症性疾患 18 例である。

2.7.2 逆受身赤血球凝集反応 (RPHA)

非働化血清を羊赤血球にて吸収 (室温、1 時間) 後 PBS にて 10 倍から段階希釈し、これを丸底マイクロタイタープレート (三光純薬) に 30 μ l/well 毎加えた。次に塩化クロミウム法¹¹⁾にてモノクローナル抗体を結合させた 2% 羊赤血球浮遊液を等量加え、室温に 4 時間放置し、凝集反応を観察した。また阻止試験として血清にあらかじめモノクローナル抗体を加え、羊赤血球の凝集が阻止されるか否かを観察した。

2.8 対応抗原の免疫化学的検討

2.8.1 粗アミロイド蛋白の解離処理

2・1 で作製した粗アミロイド蛋白を 8M 尿素を含む次の溶液 (1% sodium dodecylsulfate, 1% 2-mercaptoethanol, 0.01 M H_3PO_4 , 1M トリス塩酸塩, pH 6.8) で処理したもの、及び 0.1 N NaOH により 2 時間室温で処理した後、0.1 N HCl にて中和したものをを用いた。

2.8.2 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE), 及びウェスタンブロット法

Imai *et al.*¹²⁾ の報告に準じ 10% 及び 15% ゲルを用いて実施した。粗アミロイド蛋白を蒸留水に溶解し 3 mg/ml とし、また 2・8・1 の尿素処理蛋白、アルカリ処理蛋白もそれぞれ 3 mg/ml に調製した。2・7・2 の RPHA にて陽性、陰性各 1 例、また免疫原となった症例の血

清を選び各々 PBS にて 30 倍に希釈した。各試料の 50 μ l を SDS-PAGE にて展開後、渡辺ら¹³⁾ の方法に従ってゲルよりニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μ m, Schleicher and Schull, Germany) へ転写し、酵素抗体法を用いて抗原を検出した。

以上の検索には対照抗体としてヒト肝癌細胞 HuH7 に対し当教室において作製されたモノクローナル抗体 H2H5 (IgG1)、2・6 で述べたポリクローナル抗体 AA 蛋白抗体並びに合成 AA 蛋白に対して作製されたモノクローナル抗体 KM268 (山口大学医学部病理学第一講座、内野文弥教授より供与された) を使用した。

3 研究成績

3.1 ハイブリドーマのスクリーニング

剖検腎より抽出した粗アミロイド蛋白を抗原として行った ELISA によるスクリーニングにより 26 種 (16.9%) が陽性反応を示した。また免疫原とした患者の腎切片を用いて行った間接免疫ペルオキシダーゼ法によるスクリーニングにより 10 種のハイブリドーマ培養上清がアミロイド沈着部位に対して強く反応した。この場合、同切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本において腎糸球体に一致してエオジン好染性の無構造物質の沈着が認められ、他に細動脈にも同様の所見が認められた (Fig. 1a)。コンゴアレッド染色においては HE 染色でエオジン好染性を示した部分に相当して淡赤色に染色されており、偏光顕微鏡による観察により同部は緑色偏光を示した (Fig. 1b)。得られたハイブリドーマのうち、ハイブリドーマ AM34 の培養上清による間接免疫ペルオキシダーゼ染色を示すが (Fig. 1c)、コンゴアレッド染色で緑色偏光を示した部位に一致して、びまん性の中にやや顆粒状に染色されている。なお免疫ペルオキシダーゼ法により選択された他の 9 種のハイブリドーマ培養上清による染色パターンもほとんど同様の結果を示した。このハイブリドーマ AM34 を選び、これをクローニングし、2・2 の方法でモノクローナル抗体 AM34 を精製した。なお本抗体の免疫グロブリンサブクラスは IgG1 であった。

3.2 対応抗原の免疫組織学的検索

3.2.1 粗アミロイド蛋白による吸収試験

ELISA によって得られた結果を組織切片上で確認するために抽出した粗アミロイド蛋白による吸収試験を同様の方法により施行したが、吸収操作によりモノクローナル抗体 AM34 のアミロイド物質に対する反応は完全に消失した (Fig. 2a 及び Fig. 2b)。

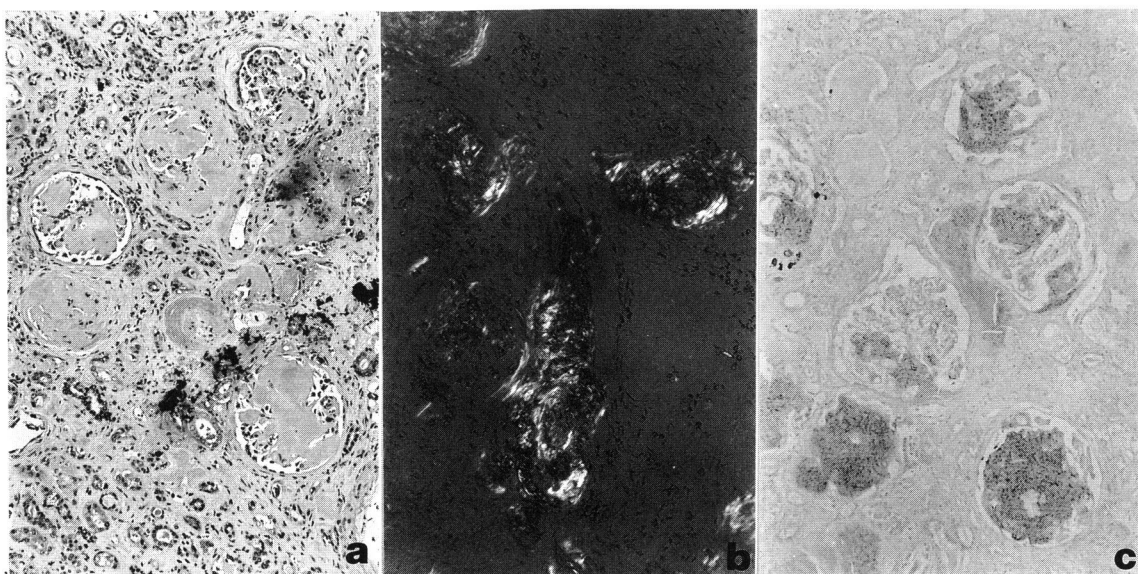


Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining was performed for kidney tissue, which was used as an immunogen. There were homogenous eosinophilic substances in the glomeruli and arterioles (a). Alkaline Congo red staining of the same section (b). Amyloid deposits demonstrated brighter areas with polarized light. An indirect immunoperoxidase staining of the same section detected by monoclonal antibody AM34 (c). (a, b, c: $\times 100$)

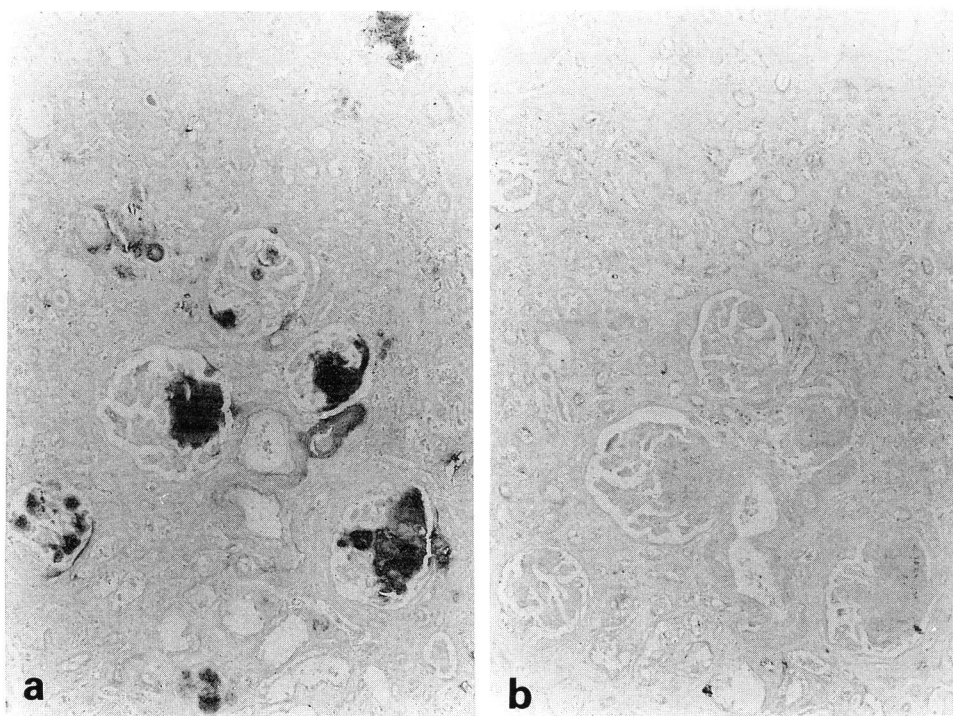


Fig. 2 Absorption experiment with crude amyloid proteins in the kidney tissue sections. The staining of monoclonal antibody AM34 (a) was completely diminished by absorption procedure of the antibody with crude amyloid proteins. (a, b: $\times 100$)

3・2・2 ウサギ抗ヒトアミロイド A ポリクローナル抗体による阻止試験

ウサギ抗ヒトアミロイド A ポリクローナル抗体による阻止試験を剖検腎切片上で間接免疫ペルオキシダーゼ法により施行したが、モノクローナル抗体 AM34 の反応性は前処置に使用されたポリクローナル抗体の濃度に依存してやや低下する傾向を示したが、濃度を増しても完全に消失することはなかった (Fig. 3a 及び Fig. 3b).

3・2・3 各種アミロイドーシス症例に対するモノクローナル抗体 AM34 の免疫組織学的反応性

2・4・1 に示した各種アミロイドーシス症例に対してモノクローナル抗体 AM34 の反応性を検討した結果を Table 1 に一括したが、本抗体は主に続発性アミロイドーシス症例のアミロイド沈着部位に対して陽性反応を示した。またその染色パターンはハイブリドーマのスクリーニングにおいてみられたように、やはりびまん性の中に顆粒状の染色像を示した。また検索し得た限りにおいては続発性アミロイドーシス以外の症例におけるアミロイド沈着には反応を示さないか、あるいはごく弱い染色性を示したのみであったが、興味ある

ことには、2 例に過ぎないがアルツハイマー型痴呆症例の脳組織 (海馬) における老人斑と思われる部位に陽性所見が認められた (Fig. 4a 及び Fig. 4b)。

3・3 血清中対応抗原の検出

次に本抗体の認識する対応抗原がヒト血清中に存在するか否かを検討する目的で RPHA を施行した。赤血球凝集反応の特異性の確認のために血清を段階希釈してモノクローナル抗体 AM34 と反応させたのちに凝集反応を行ったところ、その凝集価は加えた抗体の濃度に依存して抑制されることが観察された。対照として 2・8・2 で述べた H2H5 (IgG1) を使用したが、この場合には凝集阻止効果は認められなかった (Fig. 5)。

以上の検討に基づき、炎症性疾患、癌、非炎症性疾患及び健常者の各血清に対して RPHA を施行した。その結果、血清希釈 320 倍以上で明らかな凝集を示すものを陽性と判定すると、感染症 34 例中 17 例 (50.0%)、膠原病 (慢性関節リウマチを含む) 7 例中 3 例 (42.9%)、悪性疾患 13 例中 8 例 (61.5%)、非炎症性良性疾患 18 例中 8 例 (44.4%)、健常者 10 例中 4 例 (40.0%) に陽性反応が認められた。しかし、血中 CRP のレベルと RPHA の凝集価の間には有意な相関は認められなかつ

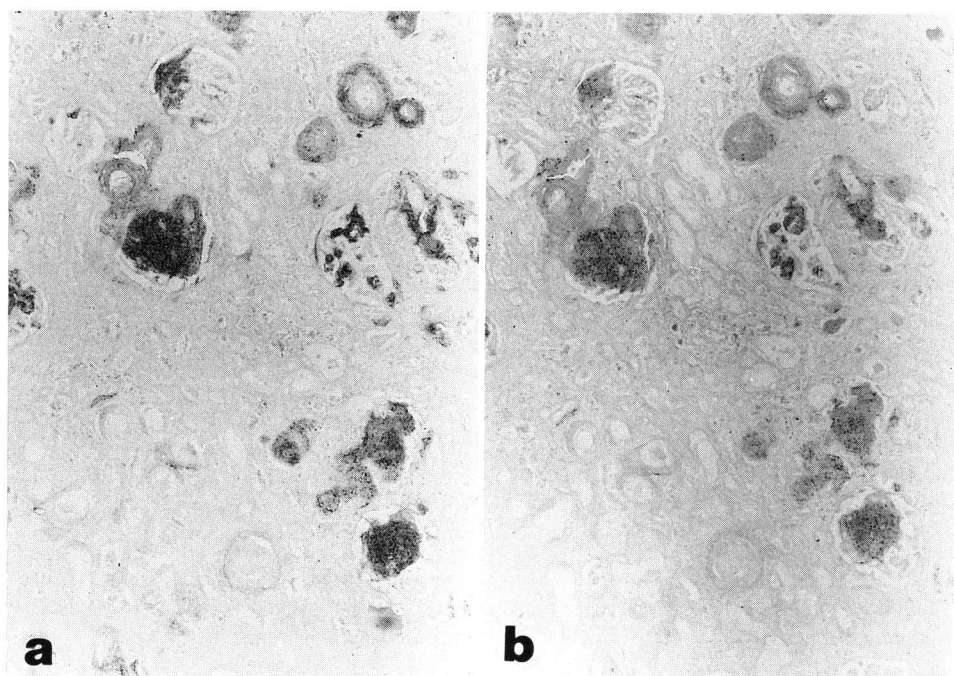


Fig. 3 Blocking experiment with anti-human amyloid A polyclonal antibodies in the kidney tissue sections. The staining of monoclonal antibody AM34 (a) was partially blocked by anti-human amyloid A polyclonal antibodies (b). (a, b: $\times 100$)

Table 1 Reactivity of the monoclonal antibody AM34 with tissues of various types of amyloidosis detected by immunoperoxidase staining.

Clinical type	Chemical type	Case No.	Tissue	Reactivity *
Secondary amyloidosis	AA	1	thyroid gland	+
			pancreas	—
			kidney	+/-
		2	intestine	+
		3	liver	+
		4	kidney	+
Primary or myeloma associated amyloidosis	AL (κ)	5	synovium	+
		6	kidney	+
		7	liver	—
			spleen	—
			heart	—
		8	colon	—
	AL (λ)	9	tongue	—
		10	colon	+/-
		11	lung	—
	AL (unknown)	12	tongue	—
		13	liver	+/-
			spleen	—
			kidney	—
		14	spleen	—
			liver	+/-
Familial amyloid polyneuropathy	AF	15	kidney	—
		16	spleen	—
			liver	—
		17	kidney	+/-
Localized amyloid	AE	18	spleen	+/-
		19	intestine	—
Skin amyloid	AD	20	pancreas	—
		21	lymph node	—
Alzheimer's disease (senile plaque)	unknown	22	skin	—
		23	brain	—
		24	brain	+
		25	brain	+

* : +, strongly positive; +/-, weakly positive; —, negative

た (Fig. 6).

3・4 対応抗原の免疫化学的検討

モノクローナル抗体 AM34 の対応抗原の分子量検索の目的で粗アミロイド蛋白を抗原として SDS-PAGE 及びウェスタンブロット法を行った。抗体のコントロールとしては、先に述べたモノクローナル抗体 H2H5 を

用いた。Fig. 7 に示すように、本抗体は未処理の粗アミロイド蛋白及び尿素処理の同蛋白に対し、45K 及び 42K ダルトンの位置で反応を示し、かつ還元、非還元下でも分子量に差異は認めなかった。さらに AA 蛋白に相当する小分子 (8K-9K ダルトン) 部分には尿素処理、あるいはアルカリ処理抗原に対しても反応性を認

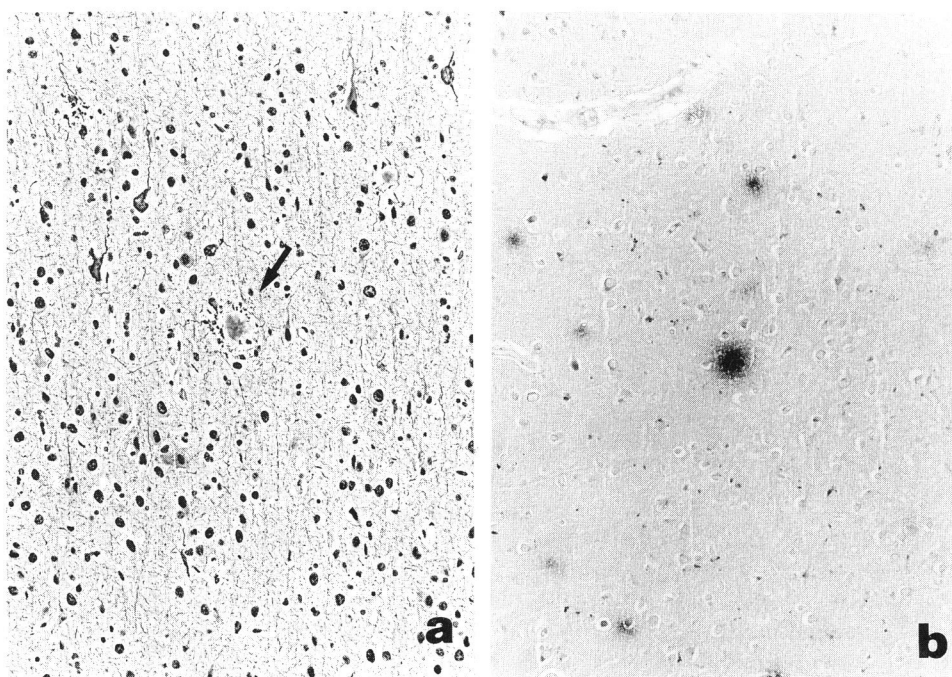


Fig. 4 Bodian staining of brain tissues (hippocampus) of a patient with Alzheimer's disease. A typical senile plaque (arrow) was recognized (a). Staining pattern of the same section with monoclonal antibody AM34. Senile plaques were strongly stained (b). (a, b: $\times 200$)

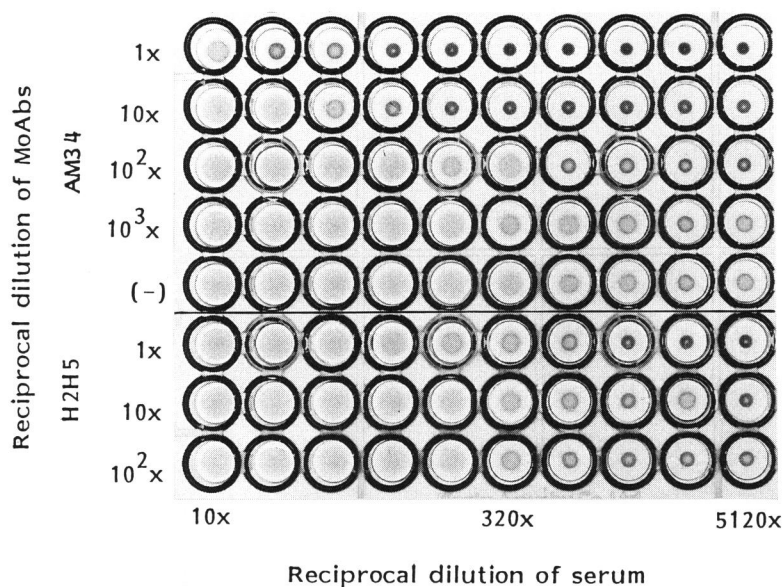


Fig. 5 Inhibition test in reversed passive hemagglutination assay employing the monoclonal antibody AM34 as an inhibitor. The details of the test are described in "Materials and Methods." Briefly, antibody AM34 was mixed with a serum sample which showed positive hemagglutination reactions. Inhibition of hemagglutination reactions was clearly seen when successive dilutions of serum of high concentration were mixed with successive dilutions of monoclonal antibody AM34. The monoclonal antibody H2H5 (IgG1) did not inhibit hemagglutination reactions.

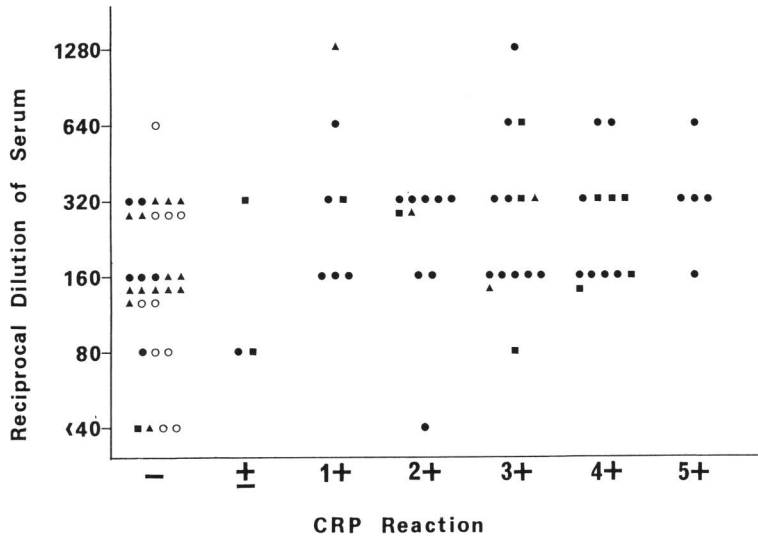


Fig. 6 Comparison between AM34 corresponding antigen levels detected by reversed passive hemagglutination assay and CRP reactions in the sera from patients with inflammatory diseases (●), malignant diseases (■), benign noninflammatory diseases (▲) and from normal controls (○). There were no significant differences ($p > 0.05$) between antigen levels and CRP reactions in each group.

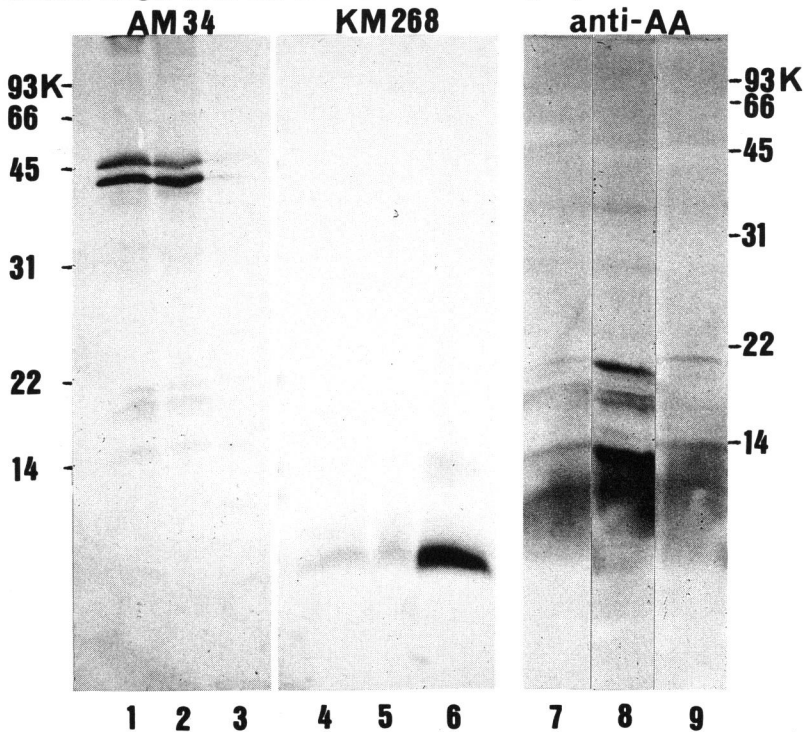


Fig. 7 SDS-PAGE (15% gel) and western blot analysis of the corresponding antigen recognized by the antibody AM34 (lanes 1, 4 and 7, crude amyloid proteins; lanes 2, 5 and 8, same proteins dissociated with 8M urea, lanes 3, 6 and 9, same proteins dissociated with 0.1N NaOH). The monoclonal antibody AM34 was used for lanes 1-3, the monoclonal antibody KM268 to AA protein for lanes 4-6, and anti-human AA polyclonal antibodies for lanes 7-9, respectively.

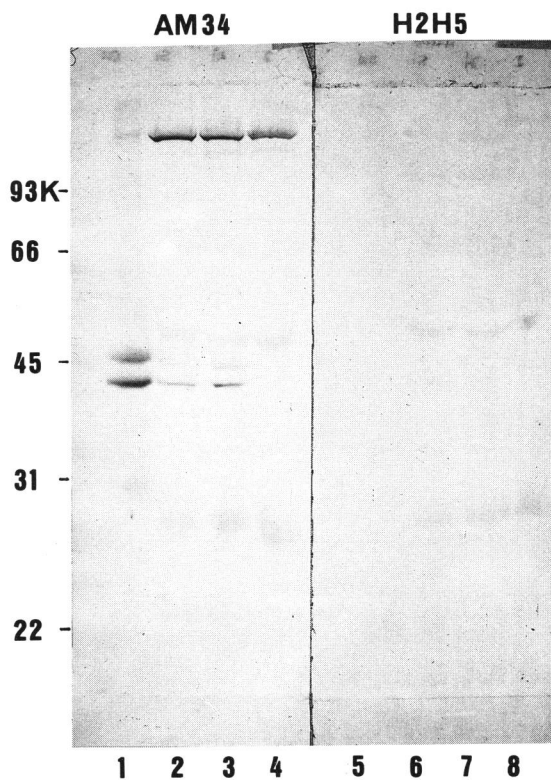


Fig. 8 The corresponding antigen in the sera recognized by antibody AM34 detected by SDS-PAGE (10% gel) and western blot analysis (lanes 1 and 5, crude amyloid protein; lanes 2 and 6, serum from the patient with secondary amyloidosis, whose kidney tissue was used as an immunogen; lanes 3 and 7, serum showing a positive reactions in reversed passive hemagglutination assay; lanes 4 and 8, serum showing a negative reactions in reversed passive hemagglutination assay).

めなかった。これに対してごく最近、合成 AA ペプチドに対して作製されたモノクローナル抗体 KM268 を用いて同様の検討を行った場合には各試料について 9K ダルトンに相当する位置に反応が認められたが、モノクローナル抗体 AM34 の反応する 45K 及び 42K ダルトンの位置には全く反応しなかった。また、ポリクローナル抗 AA 蛋白抗体を用いた場合にも、同部位への反応は認められなかった (Fig. 7)。

さらに血清中対応抗原に関しても免疫化学的検索を加えた。すなわち、RPHA 陽性例、陰性例の各血清についても同様の方法で検討を加えた。陽性例として RPHA にて 320 倍の凝集価を示した胃癌患者を、また陰性例として RPHA 陰性の健常者を選んだ。その結果 RPHA 陽性例の血清及び免疫原となった症例の血清に

おいては粗アミロイド蛋白を抗原とした場合と同様に、45K 及び 42K ダルトンの位置にモノクローナル抗体 AM34 の反応が認められたが、RPHA 陰性例の血清においては、その位置における反応性はほとんど認められなかった (Fig. 8)。

4 考 察

全身性アミロイドーシス患者剖検腎より抽出した粗アミロイド蛋白を免疫原として細胞融合法により、モノクローナル抗体 AM34 を産生するハイブリドーマを樹立した。抗体のクラスは IgG1 であった。抗体の特異性を検討する目的で、免疫原とした粗アミロイド蛋白による吸収試験、及びポリクローナル抗 AA 蛋白抗体による阻止試験を実施した。その結果、吸収試験において本抗体のアミロイド沈着部位に対する反応性に消失が認められた。これにより本抗体は免疫に用いられた粗アミロイド蛋白のみならず、同一症例の組織上のアミロイド物質とも反応することが確認された。しかしポリクローナル抗 AA 抗体による阻止効果は部分的にしか認められず、本モノクローナル抗体の反応性が完全に消失することはなかった。ウェスタンブロット法による対応抗原の検索結果を考え合わせると、これらの 2 種類の抗体の対応抗原は異なっており、免疫組織学的検索で認められたポリクローナル抗体による部分阻止の現象は、対応エпитープが極めて近傍に存在するために起こる立体的抑制によるのか、あるいは極めて一部に交叉反応性を有するためかも知れない。また、このことは免疫組織学的にポリクローナル抗体と本モノクローナル抗体 AM34 の染色パターンが多少異なる点とも関連するものと推測される。

さらに免疫組織学的検索において、本抗体は続発性アミロイドーシスにおいては、検索し得た全症例のアミロイド沈着部位に一致して陽性所見を示し、他の型のアミロイドーシス症例のアミロイド沈着部位には反応を示さなかった。ただ原発性アミロイドーシス及び骨髄腫に伴うアミロイドーシスの一部の症例に、弱い反応が認められた。この点 Falck *et al.*¹⁴⁾ は抗 AA 蛋白ポリクローナル抗血清による PAP (peroxidase-anti-peroxidase) 法を用いて 14 例の原発性、及び骨髄腫関連アミロイドーシスの腎組織を検索したところ、5 例において AA 蛋白を検出したと報告しており、免疫グロブリンアミロイドーシスにおいても炎症性病変の合併等により AA 蛋白の沈着が起こり得ることを示唆している。今回の結果についてもこのような観点から抗 AL 蛋白抗体による検索と対比してさらに検討した

いと考えている。

いずれにしても以上の免疫組織学的成績は、モノクローナル抗体 AM34 に対応する抗原エピトープが続発性アミロイドーシスのアミロイド沈着部位に多量に存在していることを示唆しており、成績には示していないが、免疫原の腎組織を用いて行った免疫電子顕微鏡的検索においても、本抗体がアミロイド繊維に一致して反応していることが確かめられている。この点についてはさらに詳細に検討して別に報告したい。

従来よりアミロイドーシスの病型診断には、各アミロイド蛋白に対する抗血清を用いた免疫組織学的方法が応用されてきたが¹⁵⁻¹⁸⁾、本モノクローナル抗体は均一な試薬であるという点でアミロイド物質の同定とアミロイドーシスの病型診断に有用であるといえよう。さらに本抗体の特徴として、免疫組織学的検討に際してホルマリン固定及びパラフィン包埋標本を使用し得る利点が挙げられる。

続発性アミロイドーシスの主要構成蛋白はアミロイド A(AA) 蛋白^{19,20)}であり、分子量 7,500-9,000 の比較的低分子の蛋白でその一次構造も明らかにされている。また、その前駆物質として血清アミロイド A 蛋白 (SAA)²¹⁻²³⁾が考えられている。SAA はアミノ酸 104 残基からなり、分子量は約 11,500 で N 末端は AA 蛋白と相同性があり、また蛋白分解酵素によって SAA の C 末端が処理を受けて AA 蛋白になるとされている²⁴⁻²⁵⁾。SAA は血中では主に high-density lipoprotein (HDL) 分画と結合し、あるいは HDL がその carrier となって存在しているとされており²⁶⁻²⁸⁾、CRP、 α_1 -acid glycoprotein などと同様に急性相蛋白 (acute phase protein) の一つとされ、急性感染症や炎症性疾患及び癌などにおいて速やかに上昇する²⁹⁻³²⁾。

アミロイド沈着部位に反応することが明らかになった本抗体についても、血清中に対応抗原が存在すると考えられたため、RPHA 法によりその検出を試みた。RPHA 阻止試験では、320 倍希釈まで強い凝集反応を示す患者血清においてモノクローナル抗体 AM34 の添加により濃度依存性に凝集阻止効果が認められた。この場合、免疫原として用いた粗アミロイド蛋白に反応しないことが確かめられており、かつ同じ免疫グロブリンクラス (IgG1) のモノクローナル抗体 H2H5 を加えても凝集阻止効果は認められないことより、本反応の特異性が確認された。

以上の基礎的検討に基づいて CRP 陽性及び陰性患者、及び正常対照群 82 例について検索したが、RPHA による凝集価と CRP 値の間には、各群別にみても有意

な相関性を検出し得なかった。今後さらに ELISA 法等を用いる定量により、またこの対応抗原の変動を経過を追って調べることにより、急性相蛋白としての意義を検討する必要がある。

さらに SDS-PAGE とウェスタンブロット法により対応抗原分子の解析を進めた。その結果、免疫に用いた蒸留水抽出粗抗原とモノクローナル抗体 AM34 の反応において、45K ダルトン及び 42K ダルトンの位置に対応抗原が検出され、これらは分子間に S-S 結合を有しないことが明らかとなった。しかし、これらの抗原それぞれの糖含量、抗原相互の関連性については今後検討を要する。またこれらの抗原は 8M 尿素処理を施しても小分子に解離することはなかった。対照として用いたモノクローナル抗体 KM268 は粗抗原中に含まれる 9K ダルトンの AA 蛋白と思われる分子と反応し、本モノクローナル抗体 AM34 は小分子 (9K ダルトン) の AA 蛋白とは反応せず、それとはエピトープを共有しない抗原に反応していることが判明した。これらの成績は血清中対応抗原についても再現された。

免疫組織学的検索成績と考え合わせると、これらの事実は続発性アミロイドーシスのアミロイド沈着部位に AA 蛋白以外のより大きな分子の蛋白が存在している可能性を示唆するものかもしれない。しかもこの抗原は分子量からみると血清中の SAA や HDL 分画 (分子量 17,000-28,000) とも異なっている。また、アミロイド P 成分 (AP 蛋白) はほとんどすべての型のアミロイド蛋白にカルシウム依存的に結合している糖蛋白であり³³⁻³⁴⁾、前駆蛋白として血清中に 9.5 S α_1 -glycoprotein (血清アミロイド P 成分; SAP) として存在するが、両者ともに通常 10 量体を形成しており、その分子量は 230K-250K ダルトンである。従って本抗体の免疫組織学的反応において認められる特異性と、対応抗原の分子量から考えると、本抗体が AP 蛋白もしくは SAP を認識している可能性は極めて低いと思われる。

また最近アルツハイマー病、あるいはアルツハイマー型痴呆を呈する患者脳の老人斑におけるアミロイド沈着がその病態及び成因に関連して注目を集めている³⁵⁻³⁶⁾。本モノクローナル抗体 AM34 は予報的段階ではあるが、これらの老人斑と思われる部位に陽性成績を示した。最近 Glenner *et al.*³⁷⁾ はアルツハイマー病の患者脳より分子量 4,200 の蛋白 (β 蛋白) を抽出、精製した。分子量に注目すると本モノクローナル抗体の認識する分子は β 蛋白とも異なっている。本モノクローナル抗体 AM34 の対応抗原に関しても、アルツハイマー患者脳

を出発材料として免疫生化学的研究を開始したばかりであり、現時点ではこの老人斑にも続発性アミロイドーシス患者から抽出された分子量 45K と 42K ダルトンの両種の抗原が存在するか否かは結論し得ない。しかし、あえて推測すればこれらの組織には共通のエピトープを有する分子が存在するのかもしれない。

以上の成績から考えるとモノクローナル抗体 AM34 は、主として続発性アミロイドーシスに、またおそらくはアルツハイマー型痴呆にも共通に関連する新しいアミロイド関連蛋白を検出しているものと推測され、今後さらに検討を続ける予定である。

5 結 論

1) 続発性アミロイドーシス患者の剖検材料より粗アミロイド蛋白を抽出し、これを免疫原としてモノクローナル抗体 AM34 を確立した。対応抗原の免疫組織学的検索により本抗体は検索し得た範囲では、続発性アミロイドーシス全症例のアミロイド沈着部位に一致して陽性所見を示し、他の型のアミロイドーシス症例のアミロイド沈着部位にはほとんど反応を示さなかった。

2) 少数例の検索ではあるが、本抗体はアルツハイマー型痴呆患者脳の老人斑と思われる部位に反応することが判明した。

3) RPHA 法により急性炎症性疾患及び癌患者血中に本抗体の対応抗原を検出したが、RPHA 法による凝集価と血中 CRP 値の間には有意な相関性は得られなかった。

4) 粗アミロイド蛋白を抗原とした SDS-PAGE 及びウェスタンブロット法により、本抗体により認識される抗原分子は 45K 及び 42K ダルトンの分子量をもつことが判明し、かつ RPHA 法陽性患者血清中にも相同の分子が検出されたが、小分子(8K-9K ダルトン)の AA 蛋白とは反応を認めなかった。

5) 以上の知見より、モノクローナル抗体 AM34 は、主として続発性アミロイドーシスに、おそらくはアルツハイマー型痴呆にも関連する新しいアミロイド関連蛋白を検出している可能性がある。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた谷内 昭教授、今井浩三講師、貴重な御教示をいただいた本学病理学第二講座、森 道夫教授、並びに貴重な組織標本を御提供くださった山口大学医学部病理学第一講座、内野文弥教授、横田忠明先生、市立札幌病院理事、伊藤哲夫先生、

東日本学園大学歯学部病理学講座、奥山富三教授及び慈恵会病院長、浦沢喜一先生、また御協力いただいた諸先生に深謝いたします。

本研究は厚生省特定疾患原発性アミロイドーシス調査研究班(谷内)及び文部省科学研究費補助金一般研究 B(谷内)の補助によった。

文 献

1. Glenner, G. G., Eanes, E. D., Bladen, H. A., Linke, R. P. and Termine, J. D.: β -pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1141-1158 (1974).
2. Eanes, E. D. and Glenner, G. G.: X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 673-677 (1968).
3. Cooper, J. H.: Selective amyloid staining as a function of amyloid composition and structure: histochemical analysis of the alkaline Congo red, standardized toluidine blue, and iodine methods. *Lab. Invest.* **31**, 232-238 (1974).
4. Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A. and Franklin, E. C.: The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.* **47**, 924-933 (1968).
5. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* **256**, 495-497 (1975).
6. Kearney, J. F., Radbruch, A., Lisegang, B. and Rajewski, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548-1550 (1979).
7. Imai, K., Ng, A. K. and Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human myeloma associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 489-496 (1981).
8. Ouchterlony, O.: Diffusion in gel. Methods for immunological analyses. *Progr. Allergy* **5**, 1-78 (1958).
9. Magnani, J. H., Stepelwski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.* **43**, 5489-5492 (1983).
10. 遠藤高夫, 今井浩三: ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出。

札幌医学雑誌 54, 393-410 (1985).

11. Imai, K. and Ferrone, S.: An indirect rosette microassay to characterize human melanoma associated antigens (MAA) recognized by operationally specific xenoantisera. *Cancer Res.* **40**, 2252-2256 (1980).
12. Imai, K., Galloway, D. R. and Ferrone, S.: Serological and immunological analysis of the specificity of xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma cells and murine fibroblasts. *Cancer Res.* **41**, 1028-1033 (1981).
13. 渡辺 武, 大原純一, 江田康幸, 松橋幸子: ブロッキング法によるモノクロナル抗体の検出. 免疫実験操作法 **11**, 3485-3489 (1982).
14. Falck, H. M. and Westermarck, P.: Protein AA in primary and myeloma associated amyloidosis. *Clin. Exp. Immunol.* **53**, 259-264 (1983).
15. Cathcart, E. S., Skinner, M. and Cohen, A. S.: Immunogenicity of amyloid. *Immunology* **20**, 945-954 (1971).
16. Husby, G. and Natvig, J. B.: Immunological characterization of amyloid fibrils in tissue sections. *Clin. Exp. Immunol.* **11**, 357-366 (1971).
17. Fujihara, S., Balow, J. E., Costa, J. C. and Glenner, G. G.: Identification and classification of amyloid in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by the unlabeled immunoperoxidase method. *Lab. Invest.* **43**, 358-365 (1980).
18. Shirahama, T., Skinner, M. and Cohen, A. S.: Immunocytochemical identification of amyloid in formalin-fixed paraffin sections. *Histochemistry* **72**, 161-171 (1981).
19. Benditt, E. P., Eriksen, N., Hermodson, M. A. and Ericsson, L. H.: The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett.* **19**, 169-173 (1971).
20. Glenner, G. G.: Amyloid deposits and amyloidosis. The β -fibrilloses. *N. Engl. J. Med.* **302**, 1283-1292 (1980).
21. Levin, M., Pras, M. and Franklin, E. C.: Immunologic studies of the major nonimmunoglobulin protein of amyloid. Identification and partial characterization of a related serum component. *J. Exp. Med.* **138**, 373-380 (1973).
22. Husby, G. and Natvig, J. B.: A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. *J. Clin. Invest.* **53**, 1054-1061 (1974).
23. Husebekk, A., Skogen, B., Husby, G. and Marhaug, G.: Transformation of amyloid precursor SAA to protein AA and incorporation in amyloid fibrils *in vivo*. *Scand. J. Immunol.* **21**, 283-287 (1985).
24. Parmelee, D. C., Titani, K., Ericsson, L. H., Eriksen, N., Benditt, E. P. and Walsh, K. A.: Amino acid sequence of amyloid-related apoprotein (apoSAA₁) from human high-density lipoprotein. *Biochemistry* **21**, 3298-3303 (1982).
25. Sletten, K., Marhaug, G. and Husby, G.: The covalent structure of amyloid-related serum protein SAA from two patients with inflammatory disease. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 1039-1046 (1983).
26. Benditt, E. P. and Eriksen, N.: Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4025-4028 (1977).
27. Scogen, B., Børresen, A. L., Natvig, J. B., Berg, K. and Michaelsen, T. E.: High-density lipoprotein as carrier for amyloid-related protein SAA in rabbit serum. *Scand. J. Immunol.* **10**, 39-45 (1979).
28. Marhaug, G., Sletten, K. and Husby, G.: Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoprotein (apoSAA). *Clin. Exp. Immunol.* **50**, 382-389 (1982).
29. Benditt, E. P., Hoffman, J. S., Eriksen, N., Parmelee, D. C. and Walsh, K. A.: SAA, an apoprotein of HDL: Its structure and function. *Ann. NY Acad. Sci.* **389**, 183-189 (1982).
30. Pepys, M. B. and Baltz, M. L.: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.* **34**, 141-212 (1983).
31. Rosenthal, C. J. and Sullivan, L. M.: Serum amyloid A to monitor cancer dissemination. *Ann. Intern. Med.* **91**, 383-390 (1979).
32. Maury, C. P. J.: Serum amyloid A protein. Current status. *Scand. J. Rheumatol.* **13**, 97-100 (1984).
33. Cathcart, E. S., Shirahama, T. and Cohen, A. S.: Isolation and identification of a plasma component of amyloid. *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 392-393 (1967).
34. Holck, M., Husby, G., Sletten, K. and Natvig, J. B.: The amyloid P component (protein AP): an integral part of the amyloid substance? *Scand. J. Immunol.* **10**, 55-60 (1979).
35. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A.,

- Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K.: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4245-4249 (1985).
36. Wong, C. W., Quaranta, V. and Glenner, G. G.: Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8729-8732 (1985).
37. Glenner, G. G. and Wong, C. W.: Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **120**, 885-890 (1984).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 山下昇史